

JP 2004-28606 A 2004.1.29

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-28606

(P2004-28606A)

(43) 公開日 平成16年1月29日(2004.1.29)

(51) Int. Cl.⁷

G01N 33/53

G01N 33/92

F1

G01N 33/53

G01N 33/92

W

A

テーマコード(参考)

2G045

審査請求 未請求 請求項の数 10 OL (全 9 頁)

(21) 出願番号

特願2002-181102(P2002-181102)

(22) 出願日

平成14年6月21日(2002.6.21)

特許法第30条第1項適用申請有り 平成14年6月17日 日本動脈硬化学会発行の「第34回日本動脈硬化学会総会プログラム・抄録集」に掲載

(71) 出願人 380037327

第一化学薬品株式会社

東京都中央区日本橋3丁目13番5号

(74) 代理人 110000084

特許業務法人アルガ特許事務所

(72) 発明者 雷崎 健

茨城県那珂郡東海村村松2117 第一化

学薬品株式会社診断薬研究所内

(72) 発明者 深町 勇

茨城県那珂郡東海村村松2117 第一化

学薬品株式会社診断薬研究所内

Fターム(参考) 20045 DA63 DA66 DA69 FB03 JA01

(54) 【発明の名称】 動脈硬化症の罹患を検査する方法

(57) 【要約】

【解決手段】 血液検体中のプレβ1-HDLを測定することからなる動脈硬化症の罹患を検査する方法。

【効果】 本発明によれば、これまで、初期診療や健康診断において、従来の脂質マーカーの検査値に異常がなく、糖尿病や高血圧といった危険因子に基づく所見も認められないため見落とされていた動脈硬化症の罹患を検査することができ、予防医学や公衆衛生学的に極めて有用である。

【選択図】 なし

(2)

JP 2004-28606 A 2004.1.29

【特許請求の範囲】

【請求項1】

血液検体中のプレβ1-HDLを測定することからなる動脈硬化症の罹患を検査する方法。

【請求項2】

血液検体中のプレβ1-HDLの存在量とそれ以外の指標とを関係付けることからなる動脈硬化症の罹患を検査する方法。

【請求項3】

血液検体中のプレβ1-HDLの存在量とHDL-コレステロールの存在量を関係付けることからなる動脈硬化症の罹患を検査する方法。

19

【請求項4】

血液検体中のプレβ1-HDLの存在量とアポ A-Iの存在量を関係付けることからなる動脈硬化症の罹患を検査する方法。

【請求項5】

動脈硬化症が、冠動脈硬化症である請求項1乃至4に記載の動脈硬化症の罹患を検査する方法。

【請求項6】

動脈硬化症が、脳動脈硬化症である請求項1乃至4に記載の動脈硬化症の罹患を検査する方法。

【請求項7】

血液検体中のプレβ1-HDLの存在量とHDL-コレステロールの存在量を関係付ける方法が、それらの存在量の比を求めることからなる請求項3に記載の動脈硬化症の罹患を検査する方法。

20

【請求項8】

血液検体中のプレβ1-HDLの存在量とアポ A-Iの存在量を関係付ける方法が、それらの存在量の比を求めることからなる請求項4に記載の動脈硬化症の罹患を検査する方法。

【請求項9】

血液検体が、(1)総コレステロール濃度が220mg/dL以下、(2)HDL-コレステロール濃度が40mg/dL以上、(3)中性脂肪が150mg/dL以下である被検者より得たものである請求項1乃至8に記載の動脈硬化症の罹患を検査する方法。

30

【請求項10】

血液検体がさらに、(4)糖尿病でない、および/または(5)高血圧でない被検者より得たものである請求項9に記載の動脈硬化症の罹患を検査する方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する分野】

本発明は、動脈硬化症の罹患を検査する方法に関するものであり、特に、HDL-コレステロールなどの従来公知の脂質マーカー、糖尿病、高血圧などの代謝性危険因子が見出されない被検者の動脈硬化症の罹患を検査する方法に関するものである。

40

【0002】

【従来の技術】

動脈硬化症(arteriosclerosis)は、動脈壁の肥厚、弾力性の低下、内腔の狭窄を呈する動脈の疾患と定義され、発症と進展に血清脂質が関与している。また心筋梗塞などの冠動脈疾患における器質的狭窄を作る原因とされている。

【0003】

動脈硬化症、特に粥状硬化症(atherosclerosis)と冠動脈疾患、血清脂質との関係は、多くの疫学調査あるいは大規模臨床試験を通じて研究され、血清総コレステロールの高値、HDL-コレステロールの低値、LDL-コレステロールの高値が冠動脈疾患発症の危険因子であることが証明された。そして、これら脂質による指標(脂質マ

50

(3)

JP 2004-28606 A 2004.1.29

ーカー)に、耐糖能の異常(糖尿病)、肥満、高血圧などを指標として加え、危険因子群を集積し、複合的に動脈硬化性疾患の危険を把握しようとする概念が提唱され今日に至っている。

【0004】

前記概念は、例えば、日本動脈硬化学会による「高脂血症治療ガイドライン」や米国National Cholesterol Education Program (NCEP)による「Adult Treatment Panel III (ATP III)」などで公衆され、臨床の場においてリスクの評価と患者の管理に使用されている。

【0005】

さらに高脂血症の薬物治療の結果を通じて、脂質マーカーの変動と虚血性脳卒中との関係も明らかになり、脂質マーカーが冠動脈に限らず、脳動脈や末梢動脈も含む全身の動脈硬化の発症や進展の指標として役立つことが示唆されている。

【0006】

しかしながら、これらの複合的概念によってもなお、動脈硬化性疾患の病態のすべてを把握することは困難である。実際、心筋梗塞の既往があるか、冠動脈造影により50%の狭窄が認められる患者においても、脂質マーカーの検査値には異常が認められず、さらに糖尿病や高血圧の危険因子も有さない患者が存在する。また心筋梗塞には無痛性のものがあり、自覚症状をあたえない場合も存在する。

【0007】

これらの事実は、例えば、従来の動脈硬化性疾患の指標、特に脂質マーカーのみでは動脈硬化症の罹患に関する情報を得ることができず、結果として初期診療や健康診断において動脈硬化症が関与する疾患の発症の可能性を見落とすことにつながることを意味する。従って、公知の指標、特に公知の脂質マーカー群とは異なる新規な動脈硬化症の指標が求められていた。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、初期診療や健康診断において、従来の脂質マーカーの検査値に異常がなく、糖尿病や高血圧といった危険因子に基づく所見も認められない被検者より採血した血液試料を分析して動脈硬化症の罹患を検査する方法を提供することにある。

【0009】

【課題を解決するための手段】

本発明者は、前記目的に適した指標の探索を行ったところ、コレステロール逆転送系に関与するリポ蛋白であるプレβ1-HDLが当該目的に使用できることを見出し本発明を完成した。

【0010】

すなわち、本発明は、血液検体中のプレβ1-HDLを測定することからなる動脈硬化症の罹患を検査する方法を提供するものであり、初期診療や健康診断において、従来の脂質マーカーの検査値に異常がなく、糖尿病や高血圧といった危険因子に基づく所見も認められない被検者より採血した血液検体中のプレβ1-HDLを測定することからなる動脈硬化症の罹患を検査する方法を提供するものである。

【0011】

プレβ1-HDLは、組織から過剰なコレステロールを引き抜き、肝臓に戻すというコレステロール逆転送系の中心的役割を担う高比重リポ蛋白(HDL)の亜分画の一つであり、前記コレステロールの引き抜きの初期に関与することが推察されている。その一方で、冠動脈性心疾患(CHD: coronary heart disease)、高中性脂肪血症(hypertriglyceridemia)、高コレステロール血症(hypercholesterolemia)において血中濃度が上昇することが報告されている(Sviridov, D. & Nestel, P.: Atherosclerosis, 161, 245-254 (2002))

【0012】

(4)

JP 2004-28606 A 2004.1.29

また、被検者より採取した血液検体を経時的にインキュベートし、検体中のプレβ1-HDLの経時的な挙動を測定することにより、脂質代謝の異常あるいは脂質代謝の異常により惹起される疾病を検出する方法（特開2001-066314）も報告されている。

【0013】

このようにプレβ1-HDLは動脈硬化症に関与する知見が幾つか報告されていたが、従来の脂質マーカーの検査値に異常がなく、糖尿病や高血圧といった危険因子に基づく所見も認められない被検者より採血した血液試料中のプレβ1-HDLを測定することにより動脈硬化症の罹患に関する情報を与える指標になることについては全く知られていなかった。以下、本発明を詳細に説明する。

【0014】

10

【発明の実施の形態】

本発明において、被検者より採取する血液検体は全血、血漿、血清のいずれであってもよい。血漿を使用する場合には、抗凝固剤としてEDTAやクエン酸ナトリウムなどを使用することができる。採血後は氷冷下におき、血漿あるいは血清を得る場合、冷却下で遠心分離することが好ましい。

【0015】

血液検体中のプレβ1-HDLは保存や凍結融解により濃度変動することが知られているが、血液検体に単糖類、二糖類またはグリセロールを共存させることにより安定化させることができる。

【0016】

20

プレβ1-HDLの測定は、公知の非変性二次元電気泳動法（Miida, T., et al.; Clin. Chem. 42, 1992-1995 (1996)）、限外濾過アイソトープ希釈法（O'Connor, P.J., et al.; Anal. Biochem. 251, 234-240 (1997)）、ゲル濾過法（Nanjee, MN. & Brinton, EA.; Clin. Chem. 46, 207-223 (2000)）、ELISA法（Miyazaki, O., et al.; J. Lipid Res. 41, 2083-2088 (2000)）などを使用することができる。これらの測定法のうち、ELISA法が再現性、簡便性などに優れており好適である。

【0017】

30

本明細書において、動脈硬化症の罹患を検査するとは、被検者から採取した血液検体中のプレβ1-HDLの存在量を測定した時点で（1）「測定の時点より以前に被検者に動脈の閉塞あるいは狭窄が存在した」、（2）「測定の時点で被検者に動脈の閉塞あるいは狭窄が存在する」、（3）「測定の時点より以降に動脈の閉塞あるいは狭窄が発生する」のいずれかに関する情報を得ることをいう。ここでいう動脈とは、冠動脈、脳動脈、末梢動脈のいずれも包含する。なお、疾病の理解は研究の進歩により変化するものである。例えば、血管の狭窄の度合いと心筋梗塞発症の関係（危険度）について、急性心筋梗塞は、冠動脈造影上50%未満の病変で68%発症しているとする報告（Folk, E., et al.; Circulation, 92, 657-671 (1995)）等があり、血管の狭窄度のみならず、病変の質すなわち脂質に富む不安定プラークの存在が危険因子であるとの最近の理解がある。したがって、本発明における動脈硬化症の罹患の語は、これらの病態も含め、その機序を限定することなく、冠動脈疾患、脳動脈疾患、末梢動脈疾患を対象に最も広義に解釈されるべきである。

【0018】

動脈硬化症罹患の検査は、血液検体中のプレβ1-HDLの存在量（濃度）について一定の基準を設定し、測定した血液検体の値を基準と比較、評価することで実施できる。基準の設定の仕方としては、健康者側、患者側のいずれからでも設定することができる。具体的には、臨床検査の分野で用いられる95パーセンタイル値を用いる方法を挙げることができる。ここで95パーセンタイル値とは、母集団のプレβ1-HDL値を低い方から並べ、母集団の95%がその値より低くなる値をいう。また、疫学調査などの結果をもとに

50

(5)

JP 2004-28606 A 2004.1.29

設定することも可能である。重要なのは所望の情報を効率良く得ることができるよう設定することである。

【0019】

また前記評価を、プレβ1-HDLの測定値単独で行う方法、プレβ1-HDLの測定値とそれ以外の指標、例えば公知の脂質マーカーの測定値を関連付けて行う方法が挙げられる。ここで、関連付ける脂質マーカーとしては、HDL-コレステロールあるいはアポA-Iを挙げることができる。なお本明細書において、存在量と存在量を関係付けるとは、計算式を使用してプレβ1-HDL単独では得ることができなかった情報を得ることをいう。

【0020】

前記存在量と存在量を関連付ける方法としては、プレβ1-HDLの存在量を公知の脂質マーカーの存在量で除し、求めた比（二つの存在量の比）を新たな指標とすることなどを例示することができる。これにより検査の精度を向上させることができる。また、HDL-コレステロールやアポA-I以外の物質の測定値（前述のように脂質以外の指標であっても良い）と適宜組み合わせることで精度を向上させることは可能であり、それらは本発明に当然に含まれる。

【0021】

なお、プレβ1-HDLは、現在、臨床上の意義、生理的役割についての知見の蓄積が行われているところであり、本出願の時点で、国際的な標準物質が存在せず、また統一された値付け方法も確立していない。従って本出願の後、国際的な標準物質や値付けの方法が提唱されることが考えられるが、その場合においても、本明細書に記載された標準物質を適宜換算することにより、支障なく本発明を実施することができることはいうまでもない。

【0022】

【発明の効果】

本発明によれば、これまで、初期診療や健康診断において、従来の脂質マーカーの検査値に異常がなく、糖尿病や高血圧といった危険因子に基づく所見も認められないため見落とされていた動脈硬化症の罹患を検査することができ、予防医学や公衆衛生学的に極めて有用である。

【0023】

【実施例】

次に実施例を挙げて本発明を更に詳細に説明するが、本発明は、これらに限定されるものではない。

【0024】

（プレβ1-HDLの測定）

（1）検体の準備

早朝空腹時に肘静脈よりEDTA入り採血管あるいは血清分離剤入り採血管により採血した全血を、冷却下で3000rpm、15分間遠心し、EDTA加血漿および血清をそれぞれ得た。得られたEDTA加血漿および血清に対し50% ショ糖水溶液を血漿あるいは血清の20倍容量加え測定まで凍結して保存した。

【0025】

（2）ELISA試薬

特開2000-239300に記載された「（1）分子量が15万以下で、かつヒトアポリポ蛋白質A-I-Iを持たないHDLに存在するヒトアポリポ蛋白質A-Iおよび（2）脂質と結合していないヒトアポリポ蛋白質A-Iと特異的に反応するモノクローナル抗体55201（ハイブリドーマ55201が産生するモノクローナル抗体）を使用するELISA試薬」を使用した。なお、標準品として使用する精製ヒトアポリポ蛋白質A-Iは、ヒト血漿より抗アポA-I抗体結合Sephroseカラムを用いたアフィニティクロマトグラフィーおよびゲルろ過法によって精製し、ウシ血清アルブミンを校正物質としてBCA法により蛋白定量してプレβ1-HDL量を設定した。

(5)

JP 2004-28606 A 2004.1.29

【0026】

(脂質マーカーの測定)

総コレステロール、HDL-コレステロール、中性脂肪は酵素法、アポA-Iは免疫比濁法(すべて第一化学薬品製)による試薬を使用した。

【0027】

(被検者の群分けの基準)

(1) 脂質マーカーの基準

日本動脈硬化学会による「高脂血症治療ガイドライン」に従い血清総コレステロール濃度が 220mg/dL 未満、中性脂肪濃度が 150mg/dL 未満、HDL-コレステロール濃度が 40mg/dL 以上を脂質マーカーの異常が無いものとして扱った。なお当該基準を満たす場合、NL(Normolipidemia、正脂血症)と略記することがある

【0028】

(2) 糖尿病(DM)の基準

日本糖尿病学会のガイドラインに従い、次の条件を満たしたものを糖尿病として扱った。即ち、静脈血漿における、空腹時血糖が 126mg/dL 以上、75OGTT2時間値が 200mg/dL 以上、随時血糖値が 200mg/dL 以上のいずれかの値が、検査日を変えて2回以上確認された場合、および1回の検査の確認だけで、次のいずれかが満たされた場合である。即ち、糖尿病の典型的症状(口渴、多飲、多尿、体重減少)が存在する場合、ヘモグロビンA1c値が6.5%以上の場合、確実な糖尿病網膜症が存在する場合である。

【0029】

(3) 高血圧(HT)の基準

日本高血圧学会のガイドラインに従い、収縮期圧 140mmHg 以上および/または拡張期圧 90mmHg 以上を高血圧として扱った。

【0030】

(被検者の群分け)

(A群): 健康 男33名、女20名、計53名

狭心症および心筋梗塞の既往歴がなく、脂質マーカーの検査値が前記基準を満たしており、糖尿病および高血圧に該当しない群。(CAD-/NL/DM-/HT-)

(B群): 冠動脈疾患 男92名、女22名、計114名

心筋梗塞の既往歴があるか、または冠動脈造影の結果、50%以上の狭窄病変を有する群。(CAD+)

(C群): 男35名、女5名、計40名

前記B群の内、脂質マーカーの検査値が基準を満たす群。(CAD+/NL)

(D群): 男13名、女0名、計13名

前記C群の内、糖尿病および高血圧に該当しない群。(CAD+/NL/DM-/HT-)

(E群): 男12名、女3名、計15名

前記C群の内、糖尿病に該当し、高血圧に該当しない群。(CAD+/NL/DM+/HT-)

(F群): 男7名、女1名、計8名

前記C群の内、高血圧に該当し、糖尿病に該当しない群。(CAD+/NL/DM-/HT+)

(G群): 男3名、女1名、計4名

前記C群の内、糖尿病および高血圧に該当する群(CAD+/NL/DM+/HT+)

(H群): 脳梗塞、男13名、女4名

脳梗塞の既往がある群。(stroke+)

(I群): 男5名、女2名、計7名

前記H群の内、脂質マーカーの検査値が基準を満たす群。(Stroke+/NL)

(7)

JP 2004-28606 A 2004.1.29

【0031】

(実施例1)

前記A群53名の内、プレβ1-HDL低値側から95%が含まれる値(39.0mg/dL)を基準値として、各群のプレβ1-HDLを評価した。結果を表1に示した。

【0032】

【表1】

群	n数	プレβ1-HDL (p値)	(1)
A群: CAD-/NL/HT-/DM-	53	23.7±8.1 (-)	3 (<5%)
B群: CAD+	114	35.2±13.3 (<0.0001)	39 (34.2%)
C群: CAD+/NL	40	35.6±12.4 (<0.0001)	16 (37.5%)
D群: CAD+/NL/DM-/HT-	13	36.6±11.2 (<0.0001)	5 (38.5%)
E群: CAD+/NL/DM+/HT-	15	33.4±15.0 (0.0285)	6 (33.3%)
F群: CAD+/NL/DM-/HT+	8	35.6±9.4 (0.0003)	3 (37.5%)
G群: CAD+/NL/DM+/HT+	4	41.2±12.6 (0.0002)	2 (50.0%)
H群: stroke+	17	31.5±9.2 (0.0014)	3 (17.6%)
I群: stroke+/NL	7	32.6±12.8 (0.0137)	2 (28.6%)

(1): 基準値以上の例数とその例数の群内での比率

【0033】

A群に対して、B～Iのいずれの群でもプレβ1-HDLの値は有意に高値であった。C～I群において基準値以上の患者が見出された。C～G群では基準値以上の例数の群内での比率は何れも30%以上であった。この成績は、プレβ1-HDLを指標にした場合、従来、動脈硬化症の罹患が見落とされていたC群、D群およびI群(冠動脈疾患、脳動脈疾患)の被検者において動脈硬化症の罹患を検出することができることを示している。

【0034】

(実施例2)

プレβ1-HDLの検査値をアポA-Iの検査値で除して比率を求めた(プレβ/A-I値)。A群53名の内、プレβ/A-I値が低値側から95%が含まれる値(2.80)を基準値として、各群のプレβ/A-I値を評価した。結果を表2に示した。

【0035】

【表2】

(8)

JP 2004-28606 A 2004.1.29

群	n数	プレβ/A-I値 (p値)	(I)
A群: CAD-/NL/HT-/DM-	53	1.64±0.60 (-)	3 (<5%)
B群: CAD+	114	3.04±1.02 (<0.0001)	60 (52.6%)
C群: CAD+/NL	40	2.88±0.94 (<0.0001)	18 (45.0%)
D群: CAD+/NL/DM-/HT-	13	2.93±0.98 (0.0005)	6 (46.2%)
E群: CAD+/NL/DM+/HT-	15	2.74±1.05 (0.0012)	5 (33.3%)
F群: CAD+/NL/DM-/HT+	8	2.90±0.82 (<0.0001)	4 (50.0%)
G群: CAD+/NL/DM+/HT+	4	3.23±0.78 (<0.0001)	3 (75.0%)
H群: stroke+	17	2.67±0.81 (<0.0001)	6 (35.3%)
I群: stroke+/NL	7	2.86±1.02 (0.0175)	2 (28.6%)

(I): 基準値以上の例数とその例数の群内での比率

【0036】

A群に対して、B～Iのいずれの群でもプレβ/A-I値は有意に高値であった。C～I群において基準値以上の例数の群内での比率は、E群およびI群がプレβ1-HDL単独での比較の場合と変わらなかったが、それ以外の群では何れも検出率が向上した。この成績は、プレβ/A-I値を指標にした場合、従来、動脈硬化症の罹患が見落とされていたC群、D群およびI群（冠動脈疾患、脳動脈疾患）の被検者において動脈硬化症の罹患を検出することができることを示している。

【0037】

(実施例3)

プレβ1-HDLの検査値をHDL-コレステロールの検査値で除して比率を求めた（プレβ/HDL値）。A群53名の内、プレβ/HDL値が低値側から95%が含まれる値（6.80）を基準値として、各群のプレβ/HDL値を評価した。結果を表3に示した。

【0038】

【表3】

(9)

JP 2004-28606 A 2004.1.29

群	n数	プレβ/HDL値 (p値)	(I)
A群: CAD-/NL/HT-/DM-	53	4.05±1.79 (-)	3 (<5%)
B群: CAD+	114	8.12±3.01 (<0.0001)	73 (64.0%)
C群: CAD+/NL	40	7.22±2.62 (<0.0001)	21 (52.5%)
D群: CAD+/NL/DM-/HT-	13	7.27±2.95 (0.0021)	7 (53.8%)
E群: CAD+/NL/DM+/HT-	15	6.71±2.58 (<0.0001)	6 (40.0%)
F群: CAD+/NL/DM-/HT+	8	7.45±2.44 (<0.0001)	4 (50.0%)
G群: CAD+/NL/DM+/HT+	4	8.52±2.49 (<0.0001)	4 (100.0%)
H群: stroke+	17	6.89±2.34 (<0.0001)	9 (52.9%)
I群: stroke+/NL	7	7.19±2.94 (0.0281)	4 (57.1%)

19

(I): 基準値以上の例数とその例数の群内での比率

【0039】

20

A群に対して、B～Iのいずれの群でもプレβ/HDL値は有意に高値であった。C～I群において基準値以上の例数の群内での比率はE群でも40%以上となり、その他の群はいずれも50%以上であった。この成績は、プレβ/HDL値を指標にした場合、従来、動脈硬化症の罹患が見落とされていたC群、D群およびI群（冠動脈疾患、脳動脈疾患）の被検者において動脈硬化症の罹患を検出することができることを示している。

METHOD FOR EXAMINING INFECTION OF ARTERIOSCLEROSIS

Publication number: JP2004028606 (A)

Publication date: 2004-01-29

Inventor(s): MIYAZAKI OSAMU; FUKAMACHI ISAMU +

Applicant(s): DAIICHI PURE CHEMICALS CO LTD +

Classification:

- international: **G01N33/53; G01N33/92; G01N33/53; G01N33/92;** (IPC1-7): G01N33/53; G01N33/92

- European:

Application number: JP20020181102 20020621

Priority number(s): JP20020181102 20020621

Abstract of JP 2004028606 (A)

PROBLEM TO BE SOLVED: To examine the infection of arteriosclerosis that is missed since there are no abnormalities in the primary examination value of a conventional lipid marker and there are no observations based on risk factors such as diabetes and high blood pressure in initial consultation and a checkup. ; SOLUTION: Pre[beta]1-HDL in a blood sample is measured, the amount of existence of the pre [beta]1-HDL in the blood sample is related to an index other than it, and the infection of the arteriosclerosis is examined. ; COPYRIGHT: (C)2004,JPO

Data supplied from the **espacenet** database — Worldwide